

## **Wird das Erbgut geschädigt - Replikationen ohne Ende?**

Prof. Dr. Günter Obe  
Ehemals Universität Duisburg-Essen  
Jetzige Anschrift:  
Gershwinstrasse 33  
14513 Teltow  
Guenter.obe@uni-due.de

### **Mutationen und Krebs**

In der Genetik werden drei Typen von Mutationen unterschieden: Genmutationen, Chromosomenmutationen und Genommutationen. Gen- und Chromosomenmutationen gehen auf spontane oder induzierte Schäden in der DNS zurück. Chromosomenmutationen sind mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Chromosomenstruktur, die auch Chromosomenaberrationen (CA) genannt werden. Bei Genommutationen liegen abweichende Chromosomenzahlen vor (Polyploidien und Aneuploidien), die meist auf Störungen des Spindelmechanismus beruhen.

Die weitaus meisten Studien zu möglichen Erbgut schädigenden Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder (HF-EMF) wurden mit cytogenetischen Methoden an menschlichen und tierischen Zellen *in vitro*, seltener auch *in vivo* durchgeführt, wobei CA und daraus abgeleitete Effekte untersucht werden. Hintergrund für derartige Studien ist die enge Korrelation zwischen mutagenen und karzinogenen Wirkungen.

In Zellen vieler Tumoren kommen typische chromosomale Veränderungen vor, die für die Entstehung der Tumoren von zentraler Bedeutung sind (Mitelman et al., 1997; 2007a, b; Adhvaryu, 2007). Erhöhte CA Frequenzen in kultivierten Lymphozyten des Menschen sind mit einem signifikant erhöhten Krebsrisiko korreliert (Bonassi, 2007). Positive Befunde zu möglichen mutagenen Wirkungen von HF-EMF wären somit auch ein deutlicher Hinweis auf eine karzinogene Wirkung dieser Felder.

### **Chromosomenaberrationen (CA)**

Chromosomen bestehen hauptsächlich aus DNS und Proteinen. Vor der DNS Synthese (G1-Phase des Zellzyklus) enthält jedes Chromosom eine Chromatide mit einem durchgehenden DNS Molekül, das während der DNS Synthese (S-Phase des Zellzyklus) repliziert wird. Am Ende der S-Phase besteht jedes Chromosom zwei Chromatiden mit jeweils wieder einem DNS Molekül. Nach der S-Phase folgt eine kurze G2-Phase, und danach die Mitose, in deren Verlauf die Chromatiden der Chromosomen auf die Zellpole verteilt werden. In der folgenden G1-Phase enthält jedes Chromosom wieder eine Chromatide mit einem DNS Molekül. Auch ohne Einwirkung von mutagenen Agenzien (Mutagenen) kommt es regelmäßig zu Schäden in der DNS, die von den zellulären Reparaturenzymen meist so repariert werden, dass der vorherige Zustand wieder hergestellt wird (Klungland and Bjelland, 2007; Vilenchik and Knudson, 2003). Seltene Fehler bei der Reparatur können zu CA führen (spontane CA Frequenzen). Werden zusätzliche DNS-Schäden induziert, nehmen Reparaturfehler (Misrepair) und damit CA Frequenzen zu. Eine signifikante Erhöhung der CA Frequenzen nach Einwirkung eines Agens, ist ein Nachweis dafür, dass dieses Agens DNS Schäden induziert und somit mutagen und karzinogen ist. CA induzierende Agenzien induzieren auch Genmutationen, die mit entsprechenden Methoden ebenfalls an somatischen Zellen analysiert werden können.

CA entstehen aus Brüchen in beiden Strängen der DNS (Doppelstrangbrüche: DSB). Nur wenige Mutagene induzieren direkt DSB, hierher gehören ionisierende Strahlen. Die meisten Mutagene führen zu Schädigungen in einzelnen DNS Strängen (Single-Strand Lesions: SSL), wie etwa Basenschäden. SSL können in der S-Phase dann zu DSB umgeformt werden, wenn sie die DNS Synthese behindern. Dabei entstehen DSB in dem DNS Strang, der die SSL enthält. Viele der induzierten DSB und SSL werden wie spontan auftretende DNS Schäden so repariert, dass sie in den Chromosomen keine sichtbaren Veränderungen hinterlassen.

Allerdings kommt es mit der Zunahme von DNS Schäden immer häufiger zu Misrepair und folglich zu CA in den Chromosomen der auf die Induktion der Schäden folgenden Mitose (Christmann et al., 2007; Goedecke, 2007; Iliakis et al., 2007; Klungland and Bjelland, 2007; Obe et al., 2002; Pfeiffer et al., 2000; Povirk, 2006). CA führen in aller Regel dazu, dass die Zellen nach wenigen Zellzyklen absterben. Die Selektion gegen Zellen mit CA erlaubt somit nur dann eine sinnvolle Aussage über Art und Frequenz induzierter CA, wenn die Untersuchung in der ersten Mitose nach Induktion der CA erfolgt (M1) (von Recklinghausen et al., 2007).

Direkt induzierte DSB führen zu CA in der Zellzyklusphase, in der sie induziert wurden. In G1 entstehen CA vom Chromosomentyp, die in der S-Phase repliziert werden und in der folgenden Mitose beide Chromatiden in gleicher Weise betreffen. Hierher gehören dizentrische Chromosomen (DIC) und zentrische Ringchromosomen, denen jeweils ein Fragment zugeordnet ist und diejenigen Fragmente, die nach Abzug von jeweils einem Fragment pro DIC und zentrischem Ringchromosom verbleiben (überzählige Fragmente). Translokationen, die ebenfalls auftreten, können meist nur mit spezifischen Färbemethoden (G-Banding; Painting) sichtbar gemacht werden (Obe and Natarajan, 2006; Obe et al, 2002). Die überwiegende Mehrzahl der Mutagene induzieren keine DSB, wohl aber verschiedene Typen von SSL, die nur dann zu CA führen, wenn die DNS in Gegenwart von SSL repliziert wird. Die Entstehung von CA aus SSL ist somit S-Phase abhängig, nicht aber die Entstehung von CA aus DSB, die S-Phase unabhängig ist. Es soll hier nochmals betont werden, dass alle CA letztlich aus DSB hervorgehen, die entweder direkt in allen Zellzyklusstadien induziert werden, oder aus SSL in der S-Phase entstehen: DSB sind ultimate Läsionen für die Entstehung von CA (Obe und Natarajan, 2006; Obe et al, 2002).

Werden DSB in der S-Phase induziert, kommt es abhängig davon, ob DSB in noch unreplizierten, oder in bereits replizierten Bereichen der Chromosomen induziert wurden, zu CA vom Chromosomen- oder Chromatidentyp. In der G2-Phase entstehen aus DSB ausschließlich CA vom Chromatidentyp. Chromatidentyp-CA sind dadurch gekennzeichnet, dass stets nur eine Chromatide von der Aberration betroffen ist. Hierher gehören Chromatid-Translokationen (RB'), die leicht als kreuzförmige Gebilde erkennbar sind und Chromatidbrüche (B'). Sogenannte Isochromatidbrüche (B''), bei denen beide Chromatiden an morphologisch homologen Bereichen gebrochen sind, können morphologisch nicht von Chromosomenbrüchen unterschieden werden. Wenn B'' aber gemeinsam mit RB' und B' auftreten, kann man davon ausgehen, dass sie Aberrationen vom Chromatidentyp sind (Obe und Natarajan, 2006).

Die Analyse von CA erfordert teilungsfähige Zellen in vitro und in vivo. In vitro Untersuchungen werden mit menschlichen Lymphocyten und mit verschiedenen primären und transformierten Zellen von Säugetieren durchgeführt. Für in vivo Analysen eignen sich bevorzugt Zellen des Knochenmarks, oder Keimbahnzellen von Mäusen und Ratten. In vivo Analysen am Menschen können an Lymphocyten des peripheren Blutes von exponierten Personen durchgeführt werden. Die meisten Lymphocyten des peripheren Blutes befinden sich nicht im Zellzyklus, sondern verharren in einem inaktiven präsynthetischen Ruhezustand (G0-Phase). Werden G0-Lymphocyten in Gegenwart eines stimulierenden

Agens (meist Phytohämagglutinin) in vitro kultiviert, treten sie in den Zellzyklus ein und werden mitotisch aktiv. Erste Mitosen in vitro (M1) werden nach CA analysiert. Sind CA Frequenzen bei exponierten Personen im Vergleich zu denjenigen entsprechender Kontrollpersonen erhöht, weist das auf eine mutagene/karzinogene Wirkung der Exposition hin (Obe und Natarajan, 2006; Sram and Rössner, 2007).

## **Mikrokerne**

Chromosomenfragmente, oder auch ganze Chromosomen, umgeben sich, wenn sie während der Mitose nicht in einen der beiden Hauptkerne gelangen, mit einer eigenen Kernmembran und bilden Mikrokerne (MN). MN werden nach ihrer Entstehung in zweikernigen Zellen nachgewiesen, bei denen unter dem Einfluss von Cytochalasin B die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung blockiert wurde (Fenech, 2007). MN mit Chromosomenfragmenten sind ein Hinweis auf CA. MN mit ganzen Chromosomen sind in der Regel das Ergebnis von Genommutationen, die meist nicht auf DNS Schäden beruhen. MN mit ganzen Chromosomen enthalten Ansatzstellen für Spindelfasern (Zentromere), die mit verschiedenen Methoden nachweisbar sind (Iarmarcovai et al, 2006; Obe und Natarajan, 2006). Ohne einen solchen Nachweis ist der Aussagewert des MN-Tests mindestens bei schwach wirkenden Mutagenen begrenzt. MN mit zentromerhaltigen CA können auch nach einer entsprechenden Färbung nicht von MN mit ganzen Chromosomen unterschieden werden. Es bleibt somit eine gewisse Unschärfe bei der Beurteilung von MN. MN Tests können wie CA Tests in vitro und in vivo durchgeführt werden (Fenech, 2007; Hayashi, 2007).

## **Schwesterchromatidenaustausche (SCE)**

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis mutagener Wirkungen beruht auf der Analyse von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE). SCE werden dadurch sichtbar gemacht, dass die chromosomale DNS differenziell mit einem Basenanalogen (meist 5-Bromdeoxyuridin) substituiert wird, indem man die Zellen etwa für zwei Zellzyklen in Gegenwart des Analogons kultiviert. Eine unterschiedliche Färbung der Chromatiden mit Giemsa-Farbe kommt dadurch zustande, dass sich die Chromatide, in der beide DNS-Stränge substituiert sind, hell und die Chromatide, in der nur ein DNS-Strang substituiert ist, dunkel färbt. SCE erkennt man an einem reziproken Austausch zwischen dunklen und hellen Chromatiden. SCE resultieren aus einer in der S-Phase erfolgten Reparatur von SSL, sie entstehen somit S-Phase abhängig. SCE sind selbst keine Mutationen, zeigen aber an, dass DNA Schäden vorhanden waren, die repariert wurden (Wojcik and Obe, 2007). Der SCE-Test wird meist in vitro durchgeführt, in vivo ist er wegen der Notwendigkeit einer differenziellen Substitution der DNS schwierig. Bei dem SCE-Test sollte bedacht werden, dass das in der DNS eingebaute Basenanalogen über eine Reaktion mit dem Testagens das Testergebnis beeinflussen könnte.

## **Comet Assay**

Der Comet Assay wird häufig bei Untersuchungen zu möglichen mutagenen Wirkungen von HF-EMF eingesetzt. Hierbei werden Zellen auf Objektträgern in einem Gel eingeschlossen und einer Elektrophorese unterworfen. DNS-Schäden wie Brüche in einzelnen oder beiden DNS-Strängen oder Alkali-sensitive Stellen führen dazu, dass DNS-Fragmente aus den Zellkernen in Richtung der Anode wandern. Die entstehenden kometenartigen Strukturen, dienen als Nachweis für DNS Schäden. Spezifische Aussagen über die Natur dieser Schäden sind nur in speziellen Fällen möglich (Müller, 2007; Müller et al., 2004).

## **Mutagene Wirkungen von HF-EMF**

HF-EMF induzieren keine DSB, eventuell auftretende positive Befunde in cytogenetischen Tests müssten somit auf SSL beruhen. Wie SSL von HF-EMF induziert werden könnten ist unklar. In HL-60 Zellen wurde nach Exposition mit HF-EMF von Fitzner und seinen Mitarbeitern eine Zunahme von Sauerstoffradikalen (ROS) nachgewiesen, die zu SSL führen könnten (REFLEX, 2004). Die Induktion von ROS unter dem Einfluss von HF-EMF tritt offenbar nur in spezifischen Zelltypen auf (Schlatterer et al., 2007) und kann somit nicht als eine generelle Erklärung für mögliche mutagene Wirkungen von HF-EMF herangezogen werden. Dafür spricht auch, dass die meisten Studien zu mutagenen Wirkungen von HF-EMF negative Ergebnisse erbracht haben.

Würden SSL nach Einwirkung von HF-EMF in der G1 Phase entstehen und würden CA in M1 analysiert, müssten CA vom Chromatidentyp auftreten und keine DIC (dizentrische Chromosomen). DIC wären höchstens dann zu erwarten, wenn nicht M1 sondern folgende Zellzyklen, etwa zweite Mitosen (M2) nach der Exposition analysiert würden. Unter diesen Bedingungen könnten aus bestimmten RB'-Typen DIC entstehen, die dann aber nicht primär induziert wurden. Ein solcher Befund würde eine lange Erholungsdauer nach Exposition erfordern und der Regel widersprechen, dass qualitative und quantitative Aussagen über die CA-induzierende Aktivität eines Testagens nur in M1 gemacht werden sollten (von Recklinghausen et al., 2007).

Zur Frage einer möglichen mutagenen Wirkung von HF-EMF wurde eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten publiziert, deren Ergebnisse in mehreren Übersichtsarbeiten kritisch gesichtet und bewertet wurden (McNamee and Bellier, 2007; Meltz, 2003; Moulder et al., 2005; Verschaeve, 2005; Vijaylaxmi and Obe, 2004). Die Übersichten zeigen, dass die Ergebnisse der meisten Studien negativ sind. Positive Befunde sind nicht immer überzeugend, weil etwa Temperatureffekte nicht ausgeschlossen werden können, oder notwendige Kontrollen nicht durchgeführt wurden. Zudem konnten positive Ergebnisse oft nicht bestätigt werden (Scarfi und Bersani, 2007; Speit et al, 2006).

Wenn EMF tatsächlich mutagen sein sollten, dann dürften die Effekte eher gering sein, was an Versuchsdurchführung und Auswertung hohe Anforderungen stellt. Replikationen ohne Ende sind nicht sinnvoll. Gut koordinierte Studien unter Beteiligung mehrerer Arbeitsgruppen mit Erfahrung in der Durchführung und Auswertung cytogenetischer Tests, wie sie von Vijayalaxmi und Obe (2005) vorgeschlagen wurden, könnten zur Aufklärung der immer noch kontroversen Befunde zu mutagenen Wirkungen von HF-EMF beitragen.

## **Literatur**

Adhvaryu, S.G. (2007) Chromosome analysis in cancer patients: applications and limitations, in G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 479-493

Bonassi, S. (2007) Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 495-504

Christmann, M., W.P. Roos, B. Kaina (2007) DNA methylation damage: formation, repair and biological consequences, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 99-121

Fenech, M. (2007) Cytogenesis-block micronucleus assay: a comprehensive "cytome" approach for measuring chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death simultaneously in one assay, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 241-255

- Goedecke, W. (2007) Double strand break repair mechanisms, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 55-65
- Hayashi, M. (2007) In vivo rodent micronucleus assay, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 257-270
- Iarmarcovai, G., S. Bonassi, I. Sari-Minodier, M. Baciuchka-Palmaro, A. Botta, T. Orsiere (2007) Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: A pooled re-analysis, *Mutation Res.* 615, 18-27
- Iliakis, G., W. Wu, M. Wang, G.I. Terzoudi, G. Pantelias (2007) Backup pathways of nonhomologous end joining may have a dominant role in the formation of chromosome aberrations, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 67-85
- Klungland, A., S. Bjelland (2007) Oxydative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1, *DNA Repair* 6, 481-488
- McNamee, J.P. and P.V. Bellier (2007) Cytogenetic and Carcinogenic effects of exposure to radiofrequency radiation, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 467-469
- Meltz, M.L. (2003) Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation, *Bioelectromagnetics Suppl.* 6, S196-S213
- Mitelman, F., F. Mertens, B. Johansson (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia, *Nature Genetics*, 15, 417-474
- Mitelman. Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2007a) Mitelman, F., B. Johansson, F. Mertens (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Mitelman, F., B. Johansson, F. Mertens (2007b) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation, *Nat. Rev. Cancer*, 7, 233-245.
- Moulder, J.E., K.R. Foster, L. S. Erdreich, J.P. McNamee (2005) Mobile phones, mobile phone base stations and cancer: a review, *Int. J. Radiat. Biol.*, 81, 189-203
- Müller, W.-U. (2007) Comet assay, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 161-176
- Müller, W.-U., J. Ciborovius, T. Bauch, C. Johannes, C. Schunck, U. Mallek, W. Böcker, G. Obe, C. Streffer (2004) Analysis of the action of the restriction endonuclease AluI using three different comet assay protocols, *Strahlenther. Oncol.* 180, 655-664
- Obe, G., A.T. Natarajan (2006) Zytogenetische Methoden, In Wichmann, Schlipkötter, Füllgraf, *Handbuch der Umweltmedizin - 34. Erg Lfg, III – 2.2.10*, 1-18
- Obe, G., P. Pfeiffer, J.R.K. Savage, C. Johannes, W. Goedecke, P. Jeppesen, A.T. Natarajan, W. Martinez-Lopez, G.A. Folle, M.E. Drets (2002) Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutation Res.* 504, 17-36
- Pfeiffer, P., W. Goedecke, G. Obe (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations, *Mutagenesis* 15, 289-302

Povirk, L. (2006) Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks, *DNA Repair* 5, 1199-1212.

REFLEX (2004) [http://www.itis.ethz.ch/downloads/REFLEX\\_Final%20Report\\_171104.pdf](http://www.itis.ethz.ch/downloads/REFLEX_Final%20Report_171104.pdf)

Scarfi, M.R., F. Bersani (2007) Radiofrequency radiation and replication studies, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 471-478

Schlatterer, K., F.H. Perschel, R.G. Fitzner (2007) Final Report IMBA, Workpackage 1 (WP1) What gaps and what uncertainties exist in the ELF- and RF-EMF cancer risk assessment? - RF-EMF and genotoxicity, <http://www.imba-research.eu/documents/charite-group-final-report-wp1-on-genotoxicity-studies.pdf/view>

Speit, G., P. Schütz, H. Hoffmann (2007) Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible, *Mutation Res.* 626, 42-47

Sram, R.J., P. Rössner (2007) Cytogenetic analysis and occupational health, in G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 325-340.

Verschaeve, L. (2005) Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, S336-S341

Vilenchik, M.M., A.G. Knudson (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12871-12876

Wojcik, A. G. Obe (2007) Sister-chromatid exchanges, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 271-283

Von Recklinghausen, U., C. Johannes, L. Riedel, G. Obe (2007) Aberration patterns and cell cycle progression following exposure of lymphocytes to the alkylating agent trenimon, In G. Obe and Vijayalaxmi (Eds.) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 315-324